动 物 学 研 究 1993, 14 (4): 361—366
Zoological Research

ISSN 0254-5853
CN 53-1040 / Q

泥鳅雌核生殖单倍体胚胎发育的研究

张梅芬 吴美锡 丁汉波
(福建师范大学生物系发育生物学研究室 350007)

摘要 本文研究了泥鳅雌核单倍体的胚胎发育。结果表明，单倍体的外部形态具有典型的单倍体综合症。单倍体的发育速度在眼黑色素期前与二倍体无明显差异，但此期以后则无法确定单倍体的发育时期。在水温为 22—25℃时，单倍体至多存活 15 d。与正常二倍体卵黄囊吸尽期同时龄的单倍体，大多数内部器官或组织发育不良，细胞核小，但核质比与二倍体无明显差异。

关键词: 泥鳅，雌核生殖单倍体，单倍体综合征

长期以来，许多学者为了研究发育机理和核质关系，对两栖类单倍体做了不少研究(吴仲庆，1984; Gurdon，1960; Hamilton，1963; Porter，1939; Ting，1951)。两栖类单倍体胚胎的主要症状表现为：头小、体短、尾上翘、水肿及循环系统等发育的不正常，即所谓的单倍体综合征(Haploid syndrome)。对两栖类单倍体产生综合征及致死的原因，学者们作了许多探讨，并提出不同的观点，但至今未得到满意的解释。

在鱼类方面，有关单倍体胚胎发育的报导甚少(Parsons *et al.*，1984; Purdon，1969)，尤其对单倍体胚胎的发育情况尚未见到详细的报导。为了解不同动物的单倍体所出现的特征是否存在共同性，以期进一步探讨单倍体致死的原因，作者对泥鳅单倍体胚胎的发育情况作了较详细的研究。

材 料 和 方 法

一、材料 泥鳅精子经 15 W 紫外线灯 (波长 253.7 nm) 照射 (照距为 42 cm) 12 min 后与本种未经照射的卵子进行授精，获得实验组。对照组为正常泥鳅精卵授精后获得的二倍体胚胎。

二、方法 1. 染色体鉴定：将发育至原肠期的实验组及对照组采用洪云汉方法(1987)进行染色体鉴定。

2. 观察实验组及对照组的胚胎发育情况。

3. 用中性福尔马林分别固定卵黄囊吸尽期的对照组及同时龄的实验组胚胎。按石蜡切片法做成 10 μ 的横、纵面的连续切片，HE 染色，在显微镜下比较二者器官或组

本文 1992 年 10 月 15 日收到，1993 年 2 月 11 日修回。

织的结构及细胞核的大小。

4. 用 Chalkey 氏落点取样法(施履吉，1964)测定原肠期及卵黄囊吸尽期的对照组及同时龄的实验组的核质比。

实 验 结 果

一、染色体验证 通过观察一定数量的原肠期胚胎的染色体标本，证实实验组的染色体数目为 n＝23，对照组的染色体数目为 2n＝46。见张梅芬(1989)。验证了实验组胚胎为雌核单倍体

二、雌核单倍体与二倍体发育的比较 1. 发育速度的比较：单倍体早期发育速度与二倍体无明显差异，如肌节、耳石、心脏等的发生以及孵化等几乎与二倍体是同时的。在眼黑色素期后，单倍体畸形愈益严重，无法确定其发育时期，因而不能进一步比较两者的发育速度。

2. 外部形态的比较：与二倍体比较，卵裂期间，泥鳅单倍体出现较多的畸形卵裂，这些异常卵裂的胚胎不能发育至原肠胚。原肠中期以后，单倍体胚胎原肠下包运动发生阻滞(图版Ⅰ：1)，卵黄不能正常内收，而留下较大的胚孔(图版Ⅰ：2)。

神经胚期，单倍体出现了比二倍体短的体形，在尾芽期时可看出明显的差异(图版Ⅰ：3)

与二倍体比较，单倍体的体节不明显，且肌节数较少。

心搏期，单倍体心搏微弱，只隐约可见；脑部呈 S 形。而二倍体的心搏清晰可见，脑部明显分化出前、中、后脑。

孵化期，单倍体胚胎的身长(2.4±0.4 mm)只及二倍体胚胎身长(3.5±0.2 mm)的 2／3 左右。胚胎尾短而上翘，卵黄较多(图版Ⅰ：4)。这时期的单倍体的心搏为 55—60 次／min，而二倍体的心搏为 67—70 次／min。

孵化后，单倍体出现的综合征愈来愈明显，主要表现为如下特征：

水肿：水肿现象首先出现在围心腔，使围心腔扩大(图版Ⅰ：5)。随后，腹腔也逐渐出现水肿。随着卵黄逐渐被吸收，在原来卵黄所占据的空间即被水肿取代(图版Ⅰ：6)。有的个体并未出现水肿，但也表现出单倍体的其他症状，这种未水肿的胚体存活时间较出现水肿的个体长。

循环系统的异常：单倍体心搏缓慢，心脏多呈纺锤形，未有心房、心室明显之分化。少数个体虽有心房、心室的出现，但极度不正常，心房出现肥大。尾循环及鳃循环很微弱，尾循环在解剖镜下勉强可见，而鳃循环则不易见到。同时龄的二倍体的心脏发育良好，尾循环及鳃循环也清晰可见。

运动迟钝：孵化后，单倍体多数以侧卧停留在培养皿底，时而在原位抖动。受到刺激时，只能不定向转圈，不能泳动。

此外，单倍体在外部形态出现的特征还有：头小、眼小且角膜不透明。全身色素稀少，胸鳍短小或只有单边胸鳍，甚至缺如。外鳃丝短小，有的只有鳃芽而没有鳃丝等。

发育至卵黄囊吸尽期的二倍体，卵黄已吸尽(图版Ⅰ：7)并开始摄食，通过透明的

肠壁可以看到其内含物的蠕动。而同时龄的单倍体卵黄尚未耗尽(图版Ⅰ：8)，其卵黄约比二倍体迟 6—8 d 吸尽，有的胚体卵黄不会被吸收而大量滞留。所有单倍体均不能摄食，在水温 22—25℃下，最多只能存活 15 d。

三、卵黄囊吸尽期的二倍体及同时龄的单倍体的器官、组织发生的组织学比较

1. 眼：卵黄囊吸尽期二倍体的视网膜发育良好，按其结构可分出色素上皮层，视锥视杆层、外核层、外网层、内核层、内网层、神经细胞层及视神经纤维等 8 层(图版Ⅱ：9)。而同时龄的单倍体，其视网膜各层界限模糊(图版Ⅱ：10)，无法区分。

2. 肝：二倍体肝脏的窦状隙很明显，其中充以血细胞，显示出典型而清晰的肝索结构(图版Ⅱ：11)。单倍体的肝脏虽与二倍体一样分为两叶，但与二倍体相比，其窦状隙狭小，不明显，血细胞很少，结构模糊(图版Ⅱ：12)。

3. 前肾：二倍体的前肾发育正常，前肾管管径为 6.2±2 μm，管腔为 1.5±0.6 μm，前肾管的细胞核圆，位于细胞中央(图版Ⅱ：13)。与二倍体比较，单倍体不但前肾管管径(12.2±3.1 μm)扩大，且相应的管腔(5.0±2.2 μm)比例也增大，前肾管的细胞核排列致密，呈圆或椭圆形，偏于细胞基部(图版Ⅱ：14)。

4. 肌肉：二倍体的肌肉组织发育良好，肌纤维排列致密(图版Ⅱ：15)。同时龄的单倍体肌纤维排列稀松并发生扭曲，肌细胞核较小(图版Ⅱ：16)。

5. 心脏：二倍体的心脏已有静脉窦、心房、心室的分化(图版Ⅱ：17)。而单倍体大多数心房、心室分化不明显，整个心脏呈纺锤形，且围心腔明显扩大(图版Ⅱ：18)。

6. 脑：通过二倍体及同时龄单倍体的中脑横切面显示，两者的脑腔均呈 T 形。但单倍体(图版Ⅱ：19)的脑壁细胞核排列致密，整个中脑较二倍体小(图片 II：20)，中脑周围的腔隙扩大，有水肿的症状。

从上述比较可以看出，单倍体大多数器官组织的发育出现了异常或不完善。另外，作者也比较了其它器官及组织的结构，发现单倍体及二倍体的肠管均已分化出食道、前肠、中肠及后肠等结构，且在组织学上无明显差异。此外，两者的胰脏、内耳等结构均无可见的差异。

7. 细胞核：测量了单倍体及二倍体肝细胞核、前肾管细胞核、血细胞核及中脑壁细胞核直径的大小，每组共测定 10 个数值。取其平均值，结果如表 1 所示。

表1　卵黄囊吸尽期二倍体及同时龄单倍体的几种组织细胞直径大小的比较(单位：μm)

Tab. 1　The comparison of nucleus diameters in some tissues or cells at the stage of york exhaustion of diploid and at the same age of haploid

种　类	二倍体(2n)	单倍体(n)	2n／n
肝细胞核	4.37±0.44	3.06±0.38	1.43
前肾管细胞核	3.43±0.43	2.26±0.18	1.51
血细胞核	2.76±0.20	2.05±0.27	1.35
中脑壁细胞核	2.94±0.13	2.17±0.12	1.35

从表 1 可看出，几种组织中单倍体的细胞核均小于二倍体的细胞核，且二倍体细胞核与单倍体细胞核大小的比率基本相似.

四、核质比　观察了原肠期的二倍体及单倍体、卵黄囊吸尽期二倍体及同时龄单倍体肝脏的各 5 个胚体的连续切片，每个切片随机观察 10 个视野，总落点数为 500 个，

最后加以统计，结果如表2所示。

从表2统计结果可知，原肠期及卵黄囊吸尽期的二倍体细胞及同时龄的单倍体细胞，两者的核质比无明显差异。

讨　论

表2　二倍体及同时龄单倍体细胞的核质比

Tab. 2　The nucleo-cytoplasmic ratio of the cells of diploid and at the same age of haploid

类　别	范围	平均数±S. D.	t检验
原肠期二倍体细胞	0.16—0.25	0.208±0.029	$t=0.169<t_{0.01}$
原肠期单倍体细胞	0.14—0.27	0.220±0.048	
卵黄囊吸尽期二倍体肝细胞	0.13—0.24	0.190±0.045	$t=0.217<t_{0.01}$
卵黄囊吸尽期同时龄的单倍体肝细胞	0.19—0.26	0.210±0.029	

在本研究中，泥鳅雌核单倍体在可以区分的发育时期(眼黑色素期)前的发育速度与同时龄的二倍体无明显的差异。这个结果与一些作者(吴仲庆，1984; Porter，1939)在两栖类单倍体中观察到的结果有所不同。许多学者发现，两栖类单倍体的发育从原肠期开始便出现滞后现象。而本研究则未发现泥鳅单倍体的发育出现滞后，因在泥鳅单倍体的发育过程中，许多组织或器官的形成，如肌节、耳石、心脏等的发生几乎是同二倍体同时发生的。不过，Porter(1939)同时也观察到，虽然两栖类单倍体的发育出现滞后，但鳃盖闭合时期则与二倍体是同时发生的。这种单倍体与二倍体同时出现的鳃盖闭合情况与本实验结果相似。

泥鳅单倍体从原肠期开始，胚胎发育出现异常，原肠下包运动发生阻滞，具较大的胚孔。而且，随着单倍体的继续发育，所表现出来的畸形症状愈来愈明显。这种现象与前人在两栖类中观察到的单倍体综合征相似。由此说明，不同动物的单倍体所表现的畸形特征具有共同性。

从卵黄囊吸尽期的二倍体及同时龄的单倍体的器官、组织的发生比较中可以看出，由中胚层分化的心脏、血窦或血管、前肾管，肌肉等及由中胚层诱导外胚层分化的脑、眼、外鳃等的发育不正常，而由内胚层分化的组织，如肝脏(不包括其中的血窦)、胰及肠上皮等的发育基本正常。因此，作者认为，在泥鳅雌核单倍体中，单套染色体组似乎主要引起中胚层及其诱导的外胚层的分化出现障碍，而对内胚层的分化影响不大。这与吴仲庆(1985)在泽蛙中观察到的结果不同。吴仲庆(1985)观察到泽蛙单倍体不仅由外、中胚层分化出来的器官发育不良，且从内胚层发育的肠上皮、肝及胆管等的发育亦异常。作者认为，这是由于所研究的动物材料不同所致。

在胚胎发育的早期，单倍体的核是处于与二倍体同数量的细胞质中，故核质比当然与二倍体不同(Esper，1965)。因此，人们认为这种不正常的核质比是单倍体综合征发生的可能原因。Esper(1965)还观察到，在发育后期的单倍体的胚胎中，细胞核及细胞质都较小，但核质比与二倍体是一致的。他在总结前人的实验结果的基础上提出，在早期胚胎发育中，核质比是不同的，但原先不正常的核质比在原肠期时得以纠正。本实验结果也表明，在原肠期时，单倍体与二倍体的核质比无明显差异，且在发育后期卵黄囊吸尽期，虽然二倍体的细胞核比同时龄的单倍体大，但从所测的细胞的核质比是一样

的。因此，该实验结果也为单倍体综合征并不是核质比率不正常所致的结论提供了证据。

从一些学者对棘皮动物、两栖类、硬骨鱼及其他物种的种间杂种的形态学研究及去核卵的发育表明，在原肠期前，胚胎的形态发生是受母本的 mRNA 和蛋白质控制的，因此，只表现出母本性状，只有在原肠期后，发育才依赖于胚胎细胞的基因组(蒋耀青等译，1985)。在本实验中，单倍体与二倍体的外部形态在原肠期前未出现明显的差异，而在原肠期后，单倍体才出现发育的异常及至内部形态结构的异常。这一事实进一步证实了胚胎的核基因组起主导作用是从原肠期开始的。因此，单倍体在原肠期后所表现的发育异常，可能是单套染色体组不能完全行使胚胎发育过程所需的正常的遗传功能的结果。

图 版 说 明

图版 I

1. 原肠期 左：单倍体 右：二倍体 ×60
2. 胚孔封闭期 左：单倍体 右：二倍体 ×50
3. 尾芽期 左：单倍体 右：二倍体 ×60
4. 孵化期 上：二倍体 下：单倍体 ×20
5. 孵化 8 h 后的胚胎 ×20
6. 临死前的单倍体胚胎 ×20
7. 卵黄囊吸尽期的正常二倍体 ×14
8. 卵黄囊吸尽期的单倍体 ×14

图版 II

9. 卵黄囊吸尽期 二倍体眼睛的横切 ×360
10. 卵黄囊吸尽期 单倍体眼睛的横切 ×360
11. 卵黄囊吸尽期 二倍体肝的横切 ×540
12. 卵黄囊吸尽期 单倍体肝的横切 ×540
13. 卵黄囊吸尽期 二倍体前肾管的横切 ×1200
14. 卵黄囊吸尽期 单倍体前肾管的横切 ×1200
15. 卵黄囊吸尽期 二倍体肌肉的纵切 ×300
16. 卵黄囊吸尽期 单倍体肌肉的纵切 ×300
17. 卵黄囊吸尽期 二倍体心脏的纵切 ×240
18. 卵黄囊吸尽期 单倍体心脏的纵切 ×240
19. 卵黄囊吸尽期 二倍体中脑的横切 ×270
20. 卵黄囊吸尽期 单倍体中脑的横切 ×270

参 考 文 献

吴仲庆. 1984. 泽蛙单倍体细胞 RNA 含量对胚胎发育和成活的影响. 动物学报，30(2): 108—113.

吴仲庆. 1985. 单套染色体在泽蛙雌核单倍体发育中的作用. 动物学报，31(1): 28—32.

洪云汉. 1987. 鱼类单个胚胎染色体标本的快速制备法. 淡水渔业，(1): 35—36.

施履吉. 1964. 定量组织学实验技术. 北京：科学出版社.

张梅芬. 1989. 泥鳅雌核生殖单倍体胚胎发育时期耗氧量的研究. 福建师范大学学报，5(增刊): 87—90.

蒋耀青等译. 1985. 早期发育的基因活性. 北京：科学出版社.

Esper H. 1965. Ribonuclei acid in haploid and diploid embryos of *Rana pipiens*. *J. Morph.*, **111**: 227–238.

Gurdon J B. 1960. The effects of ultraviolet irradiation on uncleaved eggs of *Xenopus laevis*. *Quart. J. microsc. Sci.*, **101**: 299–311.

Hamilton L. 1963. An experimental analysis of the development of the haploid syndrome in embryos of *Xenopus laevis*. *J. Embryol. Exptl. Morph.*, **16**: 559–568.

Parsons L E, G H Thorgard. 1984. Induced androgensis in Rainbow trout. *J. Exp. Zool.*, **231**: 407–412.

Porter K R. 1939. Androgentic development of the egg of *Rana pipiens*. *Biol. Bull.*, **77**: 233–257.

Purdon C E. 1969. Radiation–induced gynogenesis and androgenesis in fish. *Heredity*, **24**: 431–444.

Ding H B (丁汉波). 1951. Diploid, androgenetic and gynogenetic haploid development in anuran hybridazation. *J. Exp. Zool.*, **116**: 21–57.

STUDY ON THE DEVELOPMENT OF GYNOGENESIS HAPLOID OF *Misgurnus anguillicaudatus*

Zhang Meifen Wu Meixi Ding Hanbo

(*The Research Laboratory of Development Biology, Department of Biology, Fujian normal University* 350007)

The report which follows studies on the embryonic development of *Misgurnus anguillicaudatus*. The haploids had the obvious haploid syndrome. The development rate of gynogenesis haploids, compared with that of diploids was the same before Melanoid eye stage. But it was hardly to identify the developmental stages of gynogenesis haploids after Melanoid eye stage. The gynogenesis haploids coudn't survival for more than 15 days in 22℃ to 25℃. We had also made comparative studies on the morphogenesis of the internal orgens of the diploids at the exhaustion of york stage and those of the haploids at the same development ages as the diploids. The rusults showed that most internal organs of the haploids were imperfect and the nuclei were small, but the nucleo-cytoplasmic ratio of the cells was normal.

key words: *Misgurnus anguillicaudatus*, Gynogenesis haploid, Haploid syndrome

---

(上接第 360 页)

实际减重值 $y=92.1255-0.3694x$

$r=-0.9997$

$df=26$

$r>r_{0.001}=0.597$ ($df=26$) 负相关显著

理论减重值 $y_1=92.1559-0.4368x$

$r=-0.9997$ 负相关显著.

卵的实际减重值 (y) 与理论减重值 (x)

$y=14.2744+0.8448x$ $r=0.9996$

$\bar{x}=85.8227$ $\bar{y}=86.775$ 相关显著.

人工孵化出来的 15 只雏鸟均健康, 关于雏鸟的生长发育将另文报道.

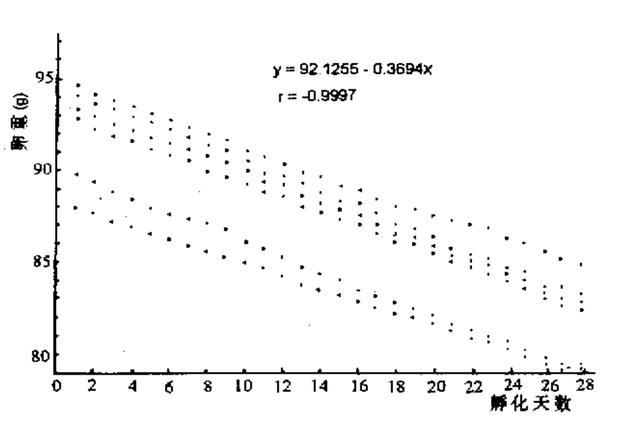


图 1 绿尾虹雉卵失重 (6 枚)

Fig. 1 The weight loss of six the Chinese Monal eggs

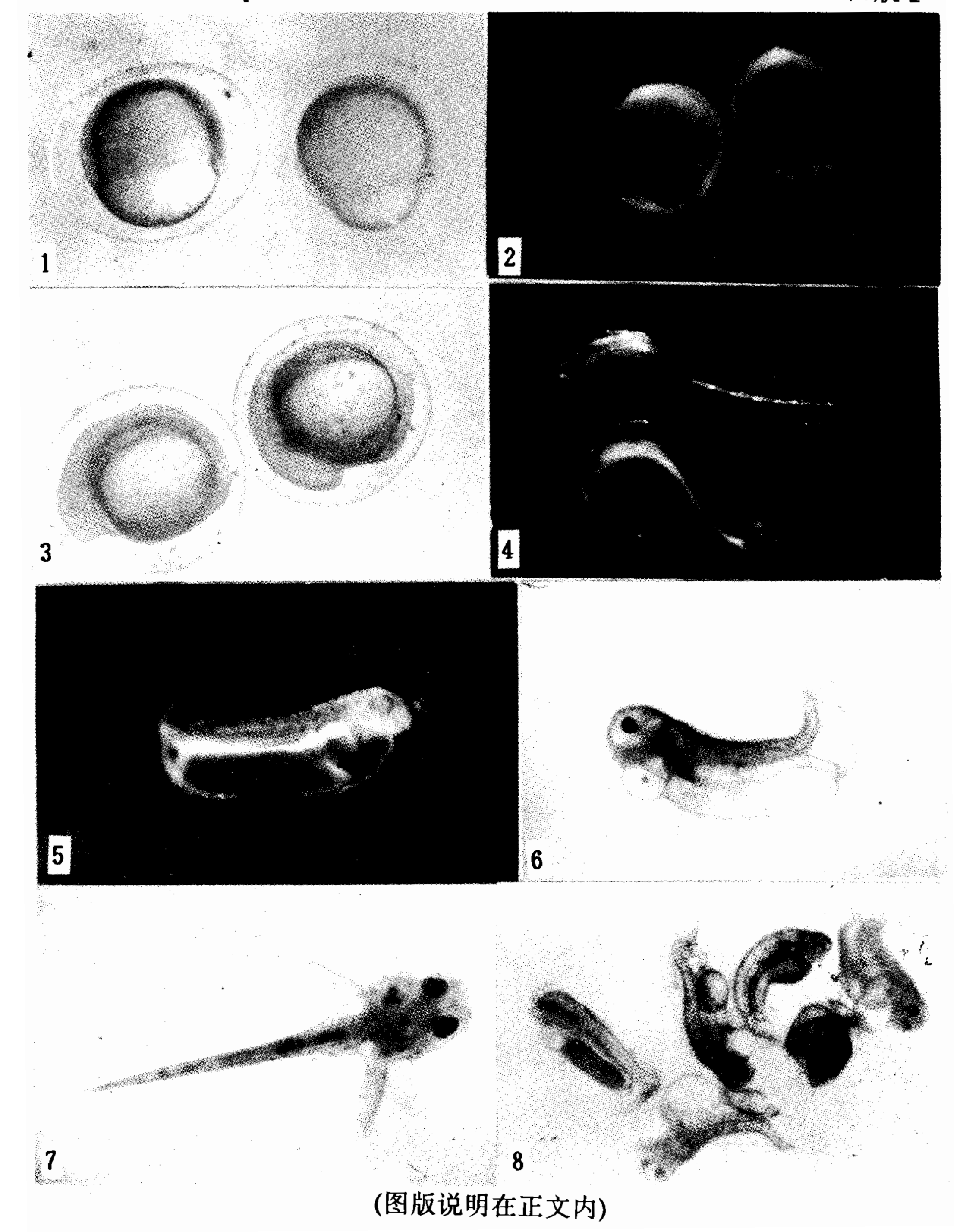
程彩云 谭玉洁 阮向东 林 虹

Cheng Caiyun Tan Yujie Ruan Xiangdong Lin Hong

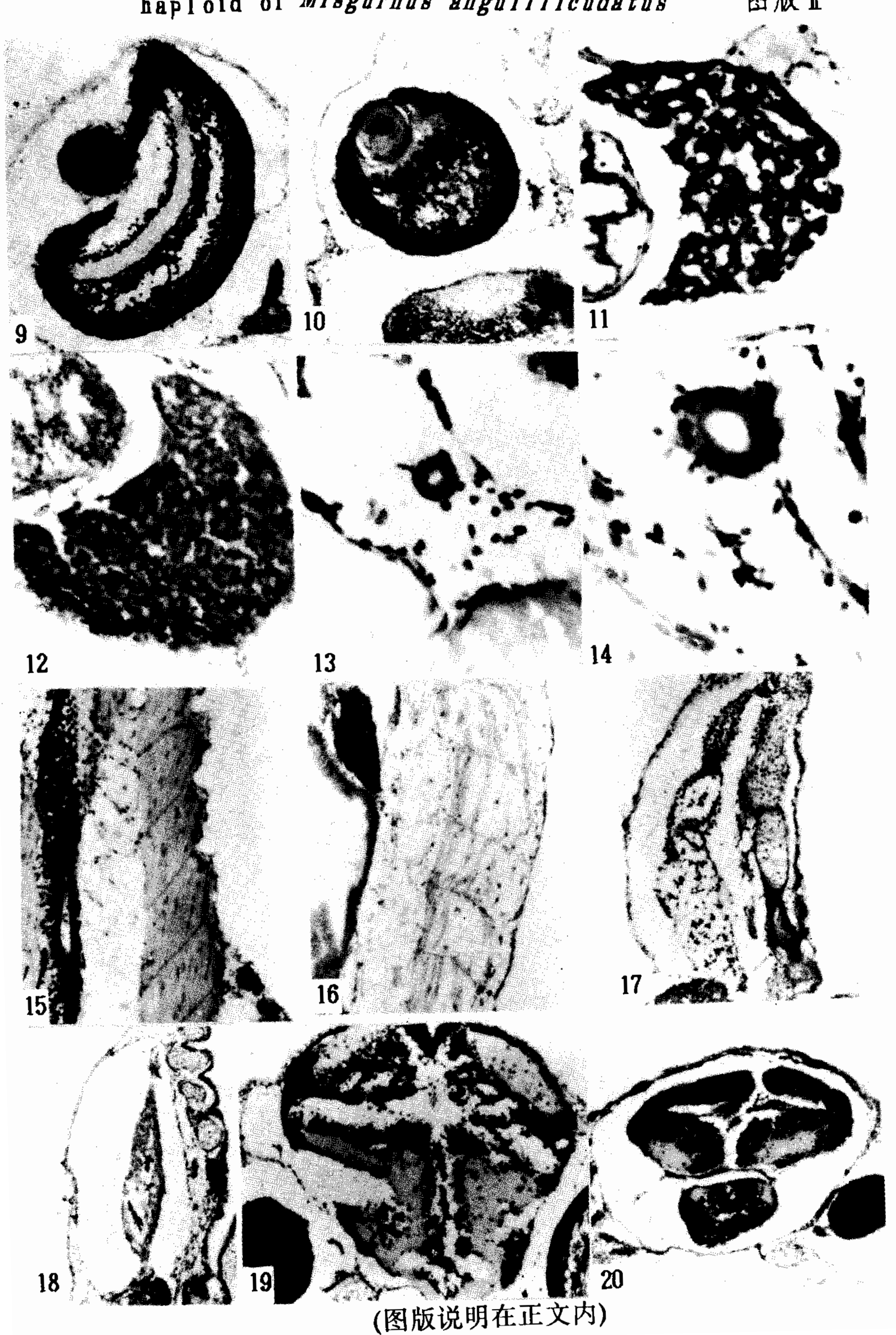
(北京濒危动物驯养繁殖中心 102602)

(*Beijing Breeding Center of Endangered Animals* 102602)

图版 I



(图版说明在正文内)



(图版说明在正文内)